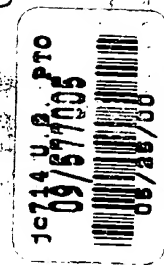


#2



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Yoko ASAKURA et al

GAU: NOT ASSIGNED

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER: NOT ASSIGNED

FILED: HEREWITH

FOR: METHOD OF CONSTRUCTING AMINO ACID PRODUCING BACTERIAL STRAINS, AND METHOD OF PREPARING AMINO ACIDS BY FERMENTATION WITH THE CONSTRUCTED AMINO ACID PRODUCING BACTERIAL STRAINS

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	10/271786	September 25, 1998
JAPAN	10/271787	September 25, 1998
WIPO	PCT/JP99/05175	September 22, 1999

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)
  - ☐ are submitted herewith
  - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

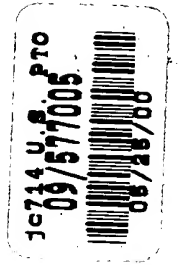
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618

William E. Beaumont  
Registration No. 30,996

Fourth Floor  
1755 Jefferson Davis Highway  
Arlington, Virginia 22202  
Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 11/98)  
I:\atty\WEB\00101108.req-prio.wpd

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 9月25日

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第271786号

出 願 人  
Applicant(s):

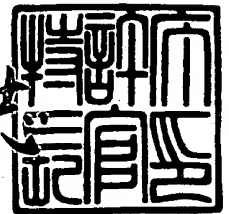
味の素株式会社



1999年 8月 4日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3054907

【書類名】 特許願

【整理番号】 Y1E0623

【提出日】 平成10年 9月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明の名称】 グルタミン酸アナログ耐性株を用いた醗酵法によるグルタミン酸の製造法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社  
発酵技術研究所内

【氏名】 木村 英一郎

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社  
発酵技術研究所内

【氏名】 朝倉 陽子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社  
発酵技術研究所内

【氏名】 中村 純

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社  
発酵技術研究所内

【氏名】 松井 和彦

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区京橋1丁目15番1号 味の素株式会社内

【氏名】 大住 剛

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社  
発酵技術研究所内

【氏名】 中松 亘

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100059959

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 稔

【選任した代理人】

【識別番号】 100067013

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 文昭

【選任した代理人】

【識別番号】 100065189

【弁理士】

【氏名又は名称】 矢戸 嘉一

【選任した代理人】

【識別番号】 100096194

【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 英人

【選任した代理人】

【識別番号】 100074228

【弁理士】

【氏名又は名称】 今城 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100084009

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 信夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100082821

【弁理士】

【氏名又は名称】 村社 厚夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100084663

【弁理士】

【氏名又は名称】 箱田 篤

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008604

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルタミン酸アナログ耐性株を用いた醗酵法によるグルタミン酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有するコリネ型L-グルタミン酸生産菌を、液体培地で培養し、培地中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを該培地から採取することを特徴とする発酵法によるL-グルタミン酸の製造方法。

【請求項2】 コリネ型グルタミン酸生産菌が、グルタミン酸脱水素酵素の活性が上昇したものである請求項1記載の方法。

【請求項3】 4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有する菌株が、染色体DNA上のグルタミン酸脱水素酵素遺伝子のプロモーターに変異を有するものである請求項1記載の方法。

【請求項4】 グルタミン酸脱水素酵素遺伝子のプロモーターが、-35領域としてTGGTCAを有し-10領域としてTATAATを有するもの、または、-35領域としてTTGTCAを有し-10領域としてTATAATを有するものである請求項3記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、グルタミン酸を高収率で生産する能力を有する変異株を用いる発酵法によるL-グルタミン酸の製造方法に関するものである。

【従来の技術】

特開昭61-268185号公報には、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH）産生遺伝子（グルタミン酸脱水素酵素遺伝子）を含むDNA断片（A）と細胞内での自立複製に必要な遺伝子を含むDNA断片（B）とを含む組換え体DNAが開示されており、この組換え体DNAを細胞に導入することによって、GDH強化株を育種することができ、微生物による物質（アミノ酸、蛋白質等）生産を改善できることが開示されている。

【0002】

特表平6-502548号公報には、コリネバクテリア菌株と、該菌株中の発現のための第一機能性DNA配列、アミノ酸、ポリペプチドおよび／または蛋白質をコードする第二DNA配列、及び上記第一及び第二DNA配列の間に挿入された第三DNA配列を含む分泌カセットとを含んでなり、該第三DNA配列が該コリネバクテリア菌株によりアミノ酸、ポリペプチドおよび／または蛋白質の分泌を保証するPS1又はPS2から選ばれた蛋白質の要素をコードすることを特徴とするコリネバクテリアの発現及び分泌系が開示されている。具体的には、ポリペプチドの分泌が開示されており、コリネバクテリア菌株にNTG変異誘発を施し、グルタミン酸アナログである4-フルオログルタミン酸(4FG)に対して耐性を与える変異株を選び、これをpCGL141での形質転換に付しており、上記アナログ耐性菌の中からGDHの発現が強化された株が取得できることが開示されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、コリネ型グルタミン酸生産菌を用いる、グルタミン酸の収率を向上させ、より安価にグルタミン酸を製造するグルタミン酸発酵法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

本発明は、従来用いられているコリネ型グルタミン酸生産菌に、変異処理を施して4-フルオログルタミン酸耐性を付与することにより誘導された変異株が、高いグルタミン酸収率を示すとの知見に基づいてなされたのである。

すなわち、本発明は、4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有するコリネ型L-グルタミン酸生産菌を、液体培地で培養し、培地中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを該培地から採取することを特徴とする発酵法によるL-グルタミン酸の製造方法を提供する。

【0004】

【発明の実施の形態】

本発明でいうコリネ型グルタミン酸生産菌とは、従来ブレヴィバクテリウム属に

分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合された細菌を含み(Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌を含む。したがって、本発明で使用する変異株は、ブレビバクテリウム属またはコリネバクテリウム属に属する下記のようなコリネ型グルタミン酸生産菌から誘導することができる。尚、本明細書において、グルタミン酸生産性に言及しない場合は、コリネバクテリウム属細菌及びブレビバクテリウム属細菌を単にコリネ型細菌ということがある。

【0005】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミクム	ATCC15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC15991
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC13032
ブレビバクテリウム・ディバリカタム	ATCC14020
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム	ATCC13869
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC15990
ブレビバクテリウム・フラバム	ATCC14067
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC17965
ブレビバクテリウム・サッカロリテイクム	ATCC14066
ブレビバクテリウム・インマリオフィルム	ATCC14068
ブレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC13825
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC19240
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC15354
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス	AJ12340(FERM BP-1539)

【0006】

上記のような菌株に紫外線照射、X線照射、放射線照射、変異誘起剤処理等の変異処理を施し、4-フルオログルタミン酸を含有する寒天平板培地上で生育可能な株を取得することにより、4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有する菌株を得ることができる。すなわち、親株の生育を抑制する濃度の4-フルオログルタミン酸を含有する寒天平板培地上に変異処理を施した菌株を塗布し、生育



してきた変異株を分離すればよい。また、4-フルオログルタミン酸に対する耐性を有する株の染色体DNA上の変異点の配列が既に明らかになっている場合には部位特異的変異法を用い変異株を取得することも出来る。

又、4-フルオログルタミン酸に対する耐性を有するとして分離した変異株を用いて、常法により醗酵法によるグルタミン酸生産を行い、グルタミン酸生産が親株より向上したものを選択するのが好ましい。

このようにして、コリネ型グルタミン酸生産菌に、4-フルオログルタミン酸に対する耐性を付与することにより、高いグルタミン酸生産能力を有する変異株を育種することができる。

#### 【0007】

本発明の育種方法では、特に、変異がGDH遺伝子のプロモーター領域に導入され、GDH活性が上昇した変異株を採取するのが好ましい。このうち、特に、GDH遺伝子のプロモーターの-35領域のDNA配列がTTGTCA、およびTGGTCAからなる群から選ばれる少なくとも一種のDNA配列となっているか、及び/又は該プロモーターの-10領域のDNA配列がTATAATとなっている変異株を採取するのが好ましい。このうち、特に、GDH遺伝子のプロモーターの-35領域のDNA配列がTTGTCA、およびTGGTCAからなる群から選ばれる少なくとも一種のDNA配列となっており、かつ、該プロモーターの-10領域のDNA配列がTATAATとなっているものが好ましい。

本発明のL-グルタミン酸の製造方法は、上記のようにして得られるコリネ型グルタミン酸生産菌のグルタミン酸アナログ耐性変異株を、液体培地に培養し、培地中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを該培地から採取することを含む。

#### 【0008】

本発明において上記変異株の培養に用いられる液体培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類、生育因子等を含有する通常の栄養培地が用いられる。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、廃糖蜜、澱粉加水分解物等の炭水化物、エタノール、グリセロール等のアルコール類、酢酸等の有機酸類が使用される。窒素源としては、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム

、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、アンモニア、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン・ステープ・リカー等が使用される。栄養要求性を有する変異株を用いる場合には、それらの要求物質を標品もしくはそれを含有する天然物として添加するのがよい。

【0009】

コリネ型細菌は一般に、ビオチン制限下でL-グルタミン酸を生産する。従って、培地中のビオチン量を制限するか、界面活性剤やペニシリンなどのビオチン作用抑制物質を添加する。

発酵は、振とう培養や通気攪拌培養等による好気条件下にて、培養液のpHを5～9の間に保持しつつ2～7日間行うのがよい。pHの調節には、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアガス、アンモニア水等を用いるのがよい。培養温度は24～37℃であるのが好ましい。

培養液中に生成蓄積したL-グルタミン酸の採取は常法によって行えばよく、例えばイオン交換樹脂法、晶析法等にすることができる。具体的には、L-グルタミン酸を陰イオン交換樹脂により吸着、分離させるか、または中和晶析させればよい。

【0010】

【発明の効果】

本発明によれば、コリネ型L-グルタミン酸生産菌に変異処理を施し、変異がGDH遺伝子のプロモーター領域に起こった、4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有する菌株を採取し、この菌株を培養することによりグルタミン酸を高収率で得ることができるので、工業的に大きな利点がある。

次に実施例により本発明を説明する。

【0011】

【実施例】

実施例1：変異株の取得

(1) 4-フルオログルタミン酸に対する耐性を有する変異株の誘導

AJ13029株はW096/06180に記載されるグルタミン酸生産株で、培養温度が31.5℃ではグルタミン酸を生産しないが、培養温度を37℃にシフトするとビオチ

ン作用抑制物質の非存在下でもグルタミン酸を生産する変異株である。本実施例では、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ13029株を変異株誘導の親株として用いた。もちろん、AJ13029株以外のグルタミン酸生産株であっても4-フルオログルタミン酸に対する耐性を有する変異株誘導の親株となりうる。

AJ13029株をCM2B寒天培地(表1)上にて31.5℃で24時間培養して菌体を得た。得られた菌体を250 µg/mlのN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンの水溶液で30℃で30分間処理した後、生存率1%の当該菌体の懸濁液を4-フルオログルタミン酸(4FG)を含む寒天平板培地(表2)に播種し、31.5℃で20~30時間培養しコロニーを形成させた。この際、初めに1 mg/mlの4FGを含む培地を傾斜をつけて作製し、その上に4FGを含まない同培地を水平に重層した。これにより、寒天培地表面は4FGの濃度勾配が作製される。このプレート上に上記変異処理菌体を播種すると、菌株の生育限界の領域を境に境界線が出来る。この境界よりも高濃度の4FGが存在する領域でコロニーを形成した株を採種した。かくして約10,000個の変異処理菌株から約50株の4FG耐性株を取得した。

【0012】

【表1】 表1 CM2B寒天培地

成 分	濃 度
ポリペプトン(日本製薬社製)	1.0%
酵母エキス(ディフコ社製)	1.0%
NaCl	0.5%
d-ビオチン	10 µg / l
寒 天	1.5%
(pH 7.2 KOHで調整)	

【0013】

【表2】 表2 寒天培地

成 分	水1リットル中の添加量
グルコース	10 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4-6\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
サイアミン塩酸塩	0.2 mg
d-ビオチン	0.05 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7.1 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.36 g
寒天	15 g

【0014】

(2) 4FGに対して耐性を示す変異株によるL-グルタミン酸の生産能の確認

上記(1)において得られた約50株の変異株及びその親株であるAJ13029株について、グルタミン酸の生産能を以下のようにして確認した。

AJ13029及び各変異株をそれぞれCM2B寒天培地上にて31.5℃で20～30時間培養して得た菌体を表3のA培地に示す組成の液体培地に接種し、31.5℃で振とう培養を開始した。約22時間後、最終濃度が表3のB培地に示す濃度になるように新たに培地を添加し、37℃にシフトさせ、その後約24時間培養を行った。培養終了後、旭化成社製バイオテックアナライザーを用いてL-グルタミン酸の生成の有無を調べた。その結果、この約50株を培養しグルタミン酸収率が親株より高く、GDH活性も高い株を2株分離した(A株およびB株)。それぞれのGDH活性を測定したところ両株ともGDHの比活性が上昇していた(表4)。GDH活性の測定はE. R. Bormann等の方法(Molecular Microbiol., 6, 317-326(1996))に従った。そこでGDH遺伝子の塩基配列を解析したところGDHのプロモーター領域内にのみ変異点が存在していた(表5)。

【0015】

【表3】 表3

成 分	A 培地		B 培地	
グルコース	3	g/dl	5	g/dl
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.14	g/dl	0.14	g/dl
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04	g/dl	0.04	g/dl
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001	g/dl	0.001	g/dl
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.001	g/dl	0.001	g/dl
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.5	g/dl	2.5	g/dl
大豆蛋白加水分解液	1.5	ml/dl	0.38	ml/dl
サイアミン塩酸塩	0.2	mg/l	0.2	mg/l
ビオチン	0.3	mg/l	0.3	mg/l
消泡剤	0.05	ml/l	0.05	ml/l
$\text{CaCO}_3$	5	g/dl	5	g/dl
pH 7.0 (KOH で調整)				

【0016】

【表4】 表4 変異株のグルタミン酸生成とGDH活性

菌 株	Glu(g/dl)	GDH比活性	相対値
AJ13029	2.9	7.7	1.0
A	3.2	22.3	2.9
B	3.1	27.0	3.5

【0017】

【表5】 表5 変異株のGDHプロモーター領域の塩基配列

菌 株	GDHプロモーター配列		
	-35		-10
AJ13029	TGGTCA	TTCTGTGCGGACTGC	CATAAT
A	TGGTCA	TTCTGTGCGGACTGC	TATAAT
B	TTGTCA	T-CTGTGCGGACTGC	TATAAT

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コリネ型グルタミン酸生産菌を用いる、グルタミン酸の収率を向上させ、より安価にグルタミン酸を製造するグルタミン酸発酵法を提供すること。

【解決手段】 4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有するコリネ型L-グルタミン酸生産菌を、液体培地で培養し、培地中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを該培地から採取することを含む発酵法によるL-グルタミン酸の製造方法。

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000000066

【住所又は居所】

東京都中央区京橋1丁目15番1号

【氏名又は名称】

味の素株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100059959

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

中村 稔

【選任した代理人】

【識別番号】

100067013

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

大塚 文昭

【選任した代理人】

【識別番号】

100065189

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

穴戸 嘉一

【選任した代理人】

【識別番号】

100096194

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

竹内 英人

【選任した代理人】

【識別番号】

100074228

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

今城 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】

100084009

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

小川 信夫

【選任した代理人】



【識別番号】 100082821  
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル  
中村合同特許法律事務所  
【氏名又は名称】 村社 厚夫  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100084663  
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル  
中村合同特許法律事務所  
【氏名又は名称】 箱田 篤

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名 味の素株式会社